



#4

11-3-01

04CO  
#4

PATENT  
Docket No. 12218/1

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

APPLICANTS: HIRAI, Fumiyasu et al.  
SERIAL NO. : 09/961,414 -  
FILED : September 25, 2001  
FOR : ENTERTOXIN ADSORBENT, METHOD OF ADSORPTIVE  
REMOVAL, AND ADSORPTION APPARATUS

ASSISTANT COMMISSIONER  
FOR PATENTS  
Washington, D.C. 20231

**CLAIM TO CONVENTION PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119**

SIR:

The Convention Priority Date of Japanese Patent Application No. 2000-291830 filed in Japan on September 26, 2000, was claimed in the Declaration/Power of Attorney filed on November 5, 2001. To complete the claim to the Convention Priority Date of said Japanese Patent Applications, a certified copy thereof is submitted herewith.

Respectfully submitted,

John C. Altmiller  
(Reg. No. 25,951)

Dated: November 14, 2001

KENYON & KENYON  
1500 K Street, N.W., Suite 700  
Washington, DC 20005-1257  
Tel: (202) 220-4200  
Fax: (202) 220-4201



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 9月26日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-291830

出 願 人

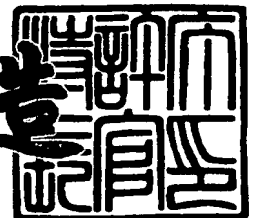
Applicant(s):

鐘淵化学工業株式会社

2001年10月26日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3093490

【書類名】 特許願

【整理番号】 OSK-4323

【提出日】 平成12年 9月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61M 1/36

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県尼崎市西昆陽 1-3-29-101

【氏名】 平井 文康

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府摂津市鳥飼西 5-5-35-209

【氏名】 藤本 民治

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市須磨区東落合 3-28-33

【氏名】 古吉 重雄

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005027

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 エンテロトキシンの吸着材、吸着除去方法および吸着器

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水不溶性担体に10gP（Pはオクタノール-水系での分配係数）値が2.50以上の化合物を固定してなるエンテロトキシンの吸着材。

【請求項2】 該水不溶性担体が水不溶性多孔質担体であることを特徴とする請求項1記載の吸着材。

【請求項3】 該水不溶性多孔質担体の球状タンパク質の排除限界分子量が5千以上60万以下である請求項2記載の吸着材。

【請求項4】 請求項1記載の吸着材にエンテロトキシンを含む体液を接触させることを特徴とする体液中のエンテロトキシンの吸着除去方法。

【請求項5】 体液の入口および出口を有し、かつ吸着材の容器外への流出防止手段を備えた容器内に、請求項1記載の吸着材を充填してなるエンテロトキシンの吸着器。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、エンテロトキシンの吸着材、その吸着除去方法および前記吸着材を充填してなる吸着器に関する。

【0002】

【従来の技術】

エンテロトキシンとはブドウ球菌の産生する毒素のひとつで、催吐作用、発熱活性、マイトジェン活性など種々の生物活性を持ち食中毒症状を引き起こしたり、トキシックショックシンドローム（TSS）の原因ともなる。

【0003】

ブドウ球菌は、ヒトをはじめとする各種動物の皮膚、鼻腔、口腔、咽頭、泌尿器、腸管、あるいは空気中、下水、河川、食品などに広く分布しており、菌種も多い。数多いブドウ球菌の中で、ヒトに病原性を示すのはコアグラゼ陽性菌である *Staphylococcus aureus*（以下黄色ブドウ球菌）。

である。黄色ブドウ球菌は種々の感染症を引き起こしたり、院内感染の起因菌となり問題となっている。

## 【0004】

黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシンは、現在のところブドウ球菌エンテロトキシンA、B、C1、C2、C3、D、E、G、H、I（以下各々SEA、SEB、SEC1、SEC2、SEC3、SED、SEE、SEG、SEH、SEIと記す）の10種類が知られている。

## 【0005】

またエンテロトキシンはスーパー抗原活性を持つことも知られている。一般の抗原は抗原提示細胞に取り込まれ、断片化（10～15個のアミノ酸からなるペプチド化）された抗原フラグメントがMHC（major histocompatibility complex）のクラスII分子のポケット部に結合した形で抗原提示細胞表面に提示される。これを特定のT細胞クローンのTCR（T cell receptor）の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が認識してT細胞が活性化され、免疫反応が進んで行く。一方、スーパー抗原の場合、抗原がフラグメント化されずに抗原提示細胞上のMHCクラスII分子に直接結合する。さらにこれがT細胞上のTCRに認識されT細胞が活性化される。この際TCRのV $\beta$ 領域で抗原が認識されるが、一般の抗原の場合と異なり、特定のV $\beta$ を表現するほとんど全てのT細胞集団に認識され、T細胞の活性化、ひいてはサイトカインの産生を引き起こす。このように、スーパー抗原に曝露した個体では、通常の特異的な免疫応答に比べて膨大な量のT細胞が活性化され、サイトカインの放出が短時間に起こるために生体の異常反応が惹起されと考えられている。

## 【0006】

エンテロトキシンに特異的な抗体、あるいはMHCクラスII蛋白質等を用いれば血液、血漿、血清等の体液や培養上清、食料品、飲料物中からエンテロトキシンを除去することは可能であるが、これらは高価であるし、滅菌により変性し吸着能力が著しく低下する等の欠点を有している。

## 【0007】

そこで、安価で簡便に製造でき、効果の高いエンテロトキシンの吸着材が強く

望まれていた。

【0008】

なお、特開平10-290833号公報には、 $\log P$ （ $P$ はオクタノール-水系での分配係数）値が2.50以上の化合物を固定したTSST-1（トキシックショックシンドロームトキシン-1）の吸着材が開示されているが、エンテロトキシンの吸着については何ら開示がない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、体液中のエンテロトキシンを効率よく吸着除去しうる吸着材、前記吸着材を用いた体液中のエンテロトキシンの吸着除去方法およびエンテロトキシン吸着器を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、体液中に存在するエンテロトキシンを効率よく吸着除去しうる吸着材について鋭意検討した。その結果、水不溶性担体に $\log P$ 値が2.50以上の化合物を固定してなる吸着材が体液中に存在するエンテロトキシンを効率よく吸着除去しうることを見だし、本発明を完成した。

【0011】

すなわち、本発明は水不溶性担体に $\log P$ （ $P$ はオクタノール-水系での分配係数）値が2.50以上の化合物を固定してなるエンテロトキシンの吸着材に関する。

【0012】

また本発明は、水不溶性担体に $\log P$ （ $P$ はオクタノール-水系での分配係数）値が2.50以上の化合物を固定してなる吸着材にエンテロトキシンを含む体液を接触させることを特徴とする体液中のエンテロトキシンの吸着除去方法に関する。

【0013】

さらに本発明は、体液の入口および出口を有し、かつ吸着材の容器外への流出防止手段を備えた容器内に、水不溶性担体に $\log P$ （ $P$ はオクタノール-水系

での分配係数) 値が2. 50以上の化合物を固定してなる吸着材を充填してなるエンテロトキシンの吸着器に関する。

#### 【0014】

#### 【発明の実施の形態】

本発明におけるエンテロトキシンとは、黄色ブドウ球菌が産生する分子量25, 000~30, 000の可溶性蛋白質からなる毒素である。

#### 【0015】

また、体液とは、血液、血漿、血清、腹水、リンパ液、関節内液およびこれらからえられた分画成分、ならびにそのほかの生体由来の液性成分をいう。

#### 【0016】

log P値とは、化合物の疎水性のパラメータであり、代表的なオクタノール-水系での分配係数Pは以下のように求められる。まず、化合物をオクタノール(もしくは水)に溶解し、これに等量の水(もしくはオクタノール)を加え、グリッフィン・フラスク・シェイカー(Griffin flask shaker)(グリッフィン・アンド・ジョージ・リミテッド(Griffin & George Ltd.)製)で30分間振盪する。そののち2000rpmで1~2時間遠心分離し、オクタノール層および水層中の化合物の各濃度を分光学的またはGLCなどの種々の方法により測定することにより次式で求められる。

#### 【0017】

$$P = C_{oct} / C_w$$

$C_{oct}$  : オクタノール層中の化合物濃度

$C_w$  : 水層中の化合物濃度

本発明の吸着材は、前記のようにして求められるlog P値が2. 50以上の化合物を水不溶性担体に固定してなる。

#### 【0018】

これまでに多くの研究者らにより種々の化合物のlog P値が実測されており、前記log Pの実測値はシー・ハンシュ(C. Hansch)らによって整理されている(「パーティション・コエフィシエンツ・アンド・ゼア・ユージズ; ケミカル・レビューズ(PARTITION COEFFICIENTS AND

THEIR USES; Chemical Reviews)」、71巻、525頁(1971))。

## 【0019】

また実測値の知られていない化合物については、アール・エフ・レッカー (R. F. Rekker) がその著書 (「ザ・ハイドロフォビック・フラグメンタル・コンスタント (THE HYDROPHOBIC FRAGMENTAL CONSTANT)」、エルセビア・サイエンティフィック・パブリッシング・カンパニー (Elsevier Sci. Pub. Com.)、アムステルダム (1977)) 中に示している疎水性フラグメント定数  $f$  を用いて計算した値 ( $\Sigma f$ ) が参考となる。疎水性フラグメント定数とは、数多くの  $\log P$  実測値をもとに、統計学的処理を行い決定された種々のフラグメントの疎水性を示す値である。化合物を構成するおのおののフラグメントの  $f$  値の和は  $\log P$  値とほぼ一致する。本発明において  $\log P$  値というとき、 $\log P$  値が知られていない化合物については  $\Sigma f$  値を意味する。

## 【0020】

エンテロトキシンの吸着に有効な化合物の探索にあたり、種々の  $\log P$  値を有する化合物を水不溶性担体に固定し、エンテロトキシンの吸着能を検討した。その結果、 $\log P$  値が2.50以上、好ましくは2.80以上、さらに好ましくは3.00以上の化合物がエンテロトキシンの吸着に有効であり、 $\log P$  値が2.50未満の化合物はほとんどエンテロトキシンの吸着能を示さないことがわかった。たとえば、化合物としてアルキルアミンを水不溶性担体に固定したばあい、アルキルアミンを  $n$ -ヘキシルアミン ( $\log P=2.06$ ) から  $n$ -オクチルアミン ( $\log P=2.90$ ) に変えると、このあいだでエンテロトキシンの吸着能は飛躍的に高まることがわかった。これらの結果より、本発明の吸着材によるエンテロトキシンの吸着能は、 $\log P$  値が2.50以上の化合物の固定により担体上に導入された原子団とエンテロトキシンとのあいだの疎水性相互作用によるものと考えられ、 $\log P$  値が2.50未満の化合物では疎水性が小さすぎるためにエンテロトキシンの吸着能を示さないことが考えられる。



## 【0021】

本発明において、水不溶性担体に固定される化合物としては、 $\log P$  値が 2.50 以上の化合物であれば特別な制限なしに用いることができる。ただし、化学結合法により担体に化合物を固定するばあい、化合物の一部が脱離することが多いが、この脱離基が化合物の疎水性に大きく寄与しているばあい、すなわち脱離により担体上に固定される原子団の疎水性が  $\Sigma f$  値で示すと 2.50 より小さくなるようなばあいには本発明の主旨から考えて、本発明に用いる化合物としては不適當である。その代表例の 1 つとして、エステル交換により水酸基を有する担体に安息香酸イソペンチルエステル ( $\Sigma f = 4.15$ ) を固定するばあいがある。このばあい、実際に担体に固定される原子団は  $C_6H_5CO-$  であり、この原子団の  $\Sigma f$  値は 1 以下である。このような化合物が、本発明で用いる化合物として適當かどうかは、脱離基の部分を水素に置き換えた化合物の  $\log P$  値が 2.50 以上かどうかにより判断すればよい。

## 【0022】

$\log P$  値が 2.50 以上の化合物の中でも、不飽和炭化水素、アルコール、アミン、チオール、カルボン酸およびその誘導体、ハロゲン化物、アルデヒド、ヒドラジド、イソシアナート、グリシジルエーテルなどのオキシラン環含有化合物、ならびにハロゲン化シランなどのように担体への結合に利用できる官能基を有する化合物が好ましい。このような化合物の代表例としては、たとえば  $n$ -ヘプチルアミン、 $n$ -オクチルアミン、デシルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、2-アミノオクテン、ナフチルアミン、フェニル- $n$ -プロピルアミン、ジフェニルメチルアミンなどのアミン類、 $n$ -ヘプチルアルコール、 $n$ -オクチルアルコール、ドデシルアルコール、ヘキサデシルアルコール、1-オクテン-3-オール、ナフトール、ジフェニルメタノール、4-フェニル-2-ブタノールなどのアルコール類およびこれらのアルコールのグリシジルエーテル類、 $n$ -オクタン酸、ノナン酸、2-ノネン酸、デカン酸、ドデカン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、オレイン酸、ジフェニル酢酸、フェニルプロピオン酸などのカルボン酸類およびこれらの酸ハロゲン化物、エステル、アミドなどのカルボン酸誘導体、塩化オクチル、臭化オクチル、塩化デシル、

塩化ドデシルなどのハロゲン化物、オクタンチオール、ドデカンチオールなどのチオール類、*n*-オクチルトリクロロシラン、オクタデシルトリクロロシランなどのハロゲン化シラン類、ならびに*n*-オクチルアルデヒド、*n*-カプリンアルデヒド、ドデシルアルデヒドなどのアルデヒド類などがあげられる。

## 【0023】

これらのほかにも、前記の例示化合物の炭化水素部分の水素原子がハロゲン、窒素、酸素、イオウなどのヘテロ原子を含有する置換基、ほかのアルキル基などで置換された化合物のうち、 $\log P$ 値が2.50以上の化合物、前述のシー・ハンシュラの総説「パーティション・コエフィシエンツ・アンド・ゼア・ユージズ；ケミカル・レビューズ、71巻、525頁、(1971)」中の555頁から613頁の表に示されている $\log P$ 値が2.50以上の化合物などを用いるが、本発明においてはこれらのみに限定されるものではない。

## 【0024】

なお、これらの化合物はそれぞれ単独で用いてもよいし、任意の2種類以上を組み合わせてもよく、さらには $\log P$ 値が2.50未満の化合物との組み合わせで用いてもよい。

## 【0025】

本発明の吸着材における水不溶性材料とは、常温常圧で固体であり水に対する溶解度が極めて小さい材料のことをいう。

## 【0026】

また、本発明における水不溶性担体の形状の例としては、たとえば粒状、板状、繊維状および中空糸状などがあげられるが、これらのみに限定されず、また前記担体の大きさもとくに限定されない。

## 【0027】

本発明の吸着材における水不溶性担体としては、ガラスビーズ、シリカゲルなどの無機担体、架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋ポリアクリルアミド、架橋ポリスチレンなどの合成高分子や結晶性セルロース、架橋セルロース、架橋アガロース、架橋デキストリンなどの多糖類からなる有機担体、さらにはこれらの組み合わせによってえられる有機-有機、有機-無機などの複

合担体などが代表例としてあげられる。

【0028】

なかでも、親水性担体が非特異吸着が比較的少なく、エンテロトキシンの吸着選択性が良好であるため好ましい。ここでいう親水性担体とは、担体を構成する化合物を平板状にしたときの水の接触角が60度以下の担体を指す。水の接触角の測定方法は種々知られているが、たとえば池田がその著書（実験化学選書・コロイド化学，第4章，界面の熱力学，75頁から104頁，裳華房（1986））に示しているごとく、化合物の平板上に水滴を置き測定する方法が最も一般的である。上記の方法で測定した水の接触角が60度以下である化合物としては、セルロース、ポリビニルアルコール、エチレン-酢酸ビニル共重合体けん化物、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリル酸グラフト化ポリエチレン、ポリアクリルアミドグラフト化ポリエチレン、ガラスなどからなる担体が代表例としてあげられる。

【0029】

これらの水不溶性担体は、適当な大きさの細孔を多数有する、すなわち多孔構造を有する担体であることがより好ましい。多孔構造を有する担体とは、基礎高分子母体が微小球の凝集により1個の球状粒子を形成する際に微小球の集塊によって形成される空間（マクロポアー）を有する担体のばあいには当然であるが、基礎高分子母体を構成する1個の微小球内の核と核との集塊の間に形成される細孔を有する担体のばあい、あるいは三次元構造（高分子網目）を有する共重合体が親和性のある有機溶媒で膨潤された状態の時に存在する細孔（ミクロポアー）を有する担体のばあいも含まれる。

【0030】

また吸着材の単位体積あたりの吸着能から考えて、多孔構造を有する水不溶性担体は、表面多孔性よりも全多孔性が好ましく、また空孔容積および比表面積は、吸着性が損なわれない程度に大きいことが好ましい。

【0031】

これらの好ましい要件を満たす担体として、多孔質セルロース担体があげられる。多孔質セルロース担体は、（1）機械的強度が比較的高く、強靱であるため

攪拌などの操作により破壊されたり微粉を生じたりすることが少なく、カラムに充填した場合体液を高速で流しても圧密化したりしないので高流速で流すことが可能となり、また細孔構造が高圧蒸気滅菌などによって変化を受けにくい、(2)担体がセルロースで構成されているため親水性であり、リガンドの結合に利用しうる水酸基が多数存在し、非特異的吸着も少ない、(3)空孔容積を大きくしても比較的強度が高いため軟質担体に劣らない吸着容量がえられる、(4)安全性が合成高分子担体等に比べて高いなどの優れた点を有しており、本発明に用いる最も適した担体の1つである。しかしながら本発明においてはこれらのみに限定されるものではなく、さらに上述の担体はそれぞれ単独で用いてもよいし、任意の2種類以上を混合して用いてもよい。

#### 【0032】

またこのような多孔構造を有する水不溶性担体は、吸着対象の物質はある程度大きな確率で細孔内に侵入できるが、他の蛋白質の侵入はできる限り起こらない特徴を有することがより好ましい。すなわち本発明の吸着材の吸着対象であるエンテロトキシンは分子量25,000~30,000の蛋白質であり、この蛋白質を効率よく吸着するためにはエンテロトキシンはある程度大きな確率で細孔内に侵入できるが、他の蛋白質の侵入はできる限り起こらないことがより好ましい。細孔内に侵入可能な物質の分子量の目安としては、排除限界分子量が一般に用いられている。排除限界分子量とは成書（たとえば、波多野博行、花井俊彦著、実験高速液体クロマトグラフ、化学同人）などに述べられているごとく、ゲル浸透クロマトグラフィーにおいて細孔内に侵入できない（排除される）分子の内最も小さい分子量をもつものの分子量をいう。排除限界分子量は一般に球状蛋白質、デキストラン、ポリエチレングリコールなどについてよく調べられているが、本発明に用いる担体の場合、球状蛋白質を用いてえられた値を用いるのが適当である。

#### 【0033】

種々の排除限界分子量の担体を用いて検討した結果、エンテロトキシンの吸着に適当な球状蛋白質の排除限界分子量の範囲は5千以上60万以下であることが明らかとなった。すなわち球状蛋白質の排除限界分子量が5千未満である担体を

用いた場合には、エンテロトキシンの吸着量は小さくその実用性が低下し、また60万を超えるものでは、エンテロトキシン以外の蛋白質（主としてアルブミン）の吸着が大きくなり、選択性の点でその実用性が低下する。従って本発明に用いる担体の球状蛋白質の排除限界分子量の好ましい範囲は5千以上60万以下、さらに好ましくは6千以上40万以下、とくに好ましくは1万以上30万以下である。

## 【0034】

さらに、担体にはリガンドの固定化反応に用いる官能基を有していることが好ましい。これらの官能基の代表例としては水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、ハロゲン基、スクシニルイミド基、酸無水物基などがあげられるが、これらに限定されるわけではない。

## 【0035】

本発明に用いる担体としては硬質担体、軟質担体のいずれも用いることができるが、体外循環用の吸着材として使用する場合には、カラムに充填し、通液する際などに目詰まりを生じないことが重要であり、そのためには十分な機械的強度が要求される。したがって本発明に用いる担体は硬質担体であることがより好ましい。ここでいう硬質担体とは、たとえば粒状担体の場合、後記参考例に示すごとく、担体を円筒状カラムに均一に充填し、水性流体を流した際の圧力損失 $\Delta P$ と流量の関係が $0.3 \text{ kg/cm}^2$ までの直線関係にあるものをいう。

## 【0036】

本発明の吸着材は $\log P$ 値が2.50以上の化合物を水不溶性多孔質担体に固定してえられるが、その固定化方法としては公知の種々の方法を特別な制限なしに用いることができる。しかしながら、本発明の吸着材を体外循環治療に供する場合には、滅菌時あるいは治療時においてのリガンドの脱離溶出を極力抑えることが安全上重要であり、そのためには共有結合法により固定化することが好ましい。

## 【0037】

本発明による吸着材を用いて体液中よりエンテロトキシンを吸着除去する方法

には種々の方法がある。最も簡便な方法としては体液を取り出してバッグなどに貯留し、これに吸着材を混合してエンテロトキシンを吸着除去した後、吸着材を濾別してエンテロトキシンが除去された体液をえる方法がある。次の方法は体液の入口と出口を有し、出口には体液は通過するが吸着材は通過しないフィルターを装着した容器に吸着材を充填し、これに体液を流す方法がある。いずれの方法も用いることができるが、後者の方法は操作も簡便であり、また体外循環回路に組み込むことにより患者の体液、とくに血液から効率よくオンラインでエンテロトキシンを除去することが可能であり、本発明の吸着材はこの方法に適している。

## 【0038】

ここでいう体外循環回路では本発明の吸着材を単独で用いることもできるが、他の体外循環治療システムとの併用も可能である。併用の例としては、人工透析回路などがあげられ、透析療法との組み合わせに用いることもできる。

## 【0039】

つぎに、前記エンテロトキシン吸着材を用いた本発明のエンテロトキシン吸着器を、一実施例の概略断面図である図1に基づき説明する。図1中、1は体液の流入口、2は体液の流出口、3は本発明のエンテロトキシン吸着材、4および5は体液および体液に含まれる成分は通過できるが前記エンテロトキシン吸着材は通過できないフィルター、6はカラム、7はエンテロトキシン吸着器である。しかしながら、エンテロトキシン吸着器はこのような具体例に限定されるものではなく、液の入口、出口を有し、かつエンテロトキシン吸着材の容器外への流出防止具を備えた容器内に前記吸着材を充填したものであれば、どのようなものでもよい。

## 【0040】

前記流出防止具には、メッシュ、不織布、綿栓などのフィルターがあげられる。また、容器の形状、材質、大きさにはとくに限定はないが、形状としては筒状容器が好ましい。容器の材質として好ましいのは耐滅菌性を有する素材であるが、具体的にはシリコンコートされたガラス、ポリプロピレン、塩化ビニール、ポリカーボネート、ポリサルフォン、ポリメチルペンテンなどが挙げられる。容器

の容量は50～1500mlで直径は2～20cmが好ましく、さらに容量は100～800mlで直径は3～15cmが好ましく、特に容量は150～400mlで直径は4～10cmが好ましい。

【0041】

【実施例】

以下、実施例において本発明についてさらに詳細に述べるが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

【0042】

(参考例)

両端に孔径15 $\mu$ mのフィルターを装着したガラス製円筒カラム（内径9mm、カラム長150mm）にアガロース材料（バイオラッド(Bio-rad)社製のBiogel A-5m、粒径50～100メッシュ）、ビニル系高分子材料（東ソー（株）製のトヨパールHW-65、粒径50～100 $\mu$ m）およびセルロース材料（チッソ（株）製のセルロファインGC-700m、粒径45～105 $\mu$ m）をそれぞれ均一に充填し、ペリスタティックポンプにより水を流し、流量と圧力損失 $\Delta P$ との関係を求めた。その結果を図2に示す。

【0043】

図2に示すごとく、トヨパールHW-65およびセルロファインGC-700mが圧力の増加にほぼ比例して流量が増加するのに対し、Biogel A-5mは圧密化を引き起こし、圧力を増加させても流量が増加しないことがわかる。本発明においては前者のごとく、圧力損失 $\Delta P$ と流量の関係が0.3kg/cm<sup>2</sup>までの直線関係にあるものを硬質材料という。

【0044】

(実施例1)

セルロース系多孔質担体であるセルロファインGC-200m（チッソ（株）製、球状蛋白質の排除限界分子量140,000）170mlに水を加えて全量340mlとしたのち、2M水酸化ナトリウム水溶液90mlを加え40℃とした。これにエピクロルヒドリン31mlを加え、40℃で攪拌下2時間反応させた。反応終了後、十分に水洗し、エポキシ化セルロファインGC-200mをえ

た。

【0045】

このエポキシ化セルロファインGC-200mを10mlとり、n-ヘキサデシルアミン ( $\Sigma f = 7.22$ ) 200mgを加え、エタノール中、45℃で静置下、6日間反応させた。反応終了後、エタノール、水の順に充分洗浄し、n-ヘキサデシルアミン固定化セルロファインGC-200mをえた。

【0046】

このn-ヘキサデシルアミン固定化セルロファインGC-200mを0.5mlとり、3種類のエンテロトキシン、SEA、SEB、SEC1を各々約600pg/ml含むウシ胎児血清（以下FBSと記す）3mlと混合し、37℃にて2Hrs振盪した。2Hrs後、吸着材と上清を分離し、上清の各エンテロトキシン濃度をELISA法にて測定した。

【0047】

各エンテロトキシンのELISAは以下のようにして行った。一次抗体ウサギ抗SEA（またはSEB、SEC）IgG（トキシンテクノロジー社製）をコーティング緩衝液で希釈しマイクロプレートに100μlずつ分注した。4℃で一晩おいたのち、マイクロプレートを洗浄した。3%ウシ血清アルブミン溶液を200μlずつマイクロプレートに分注し、室温で2時間おいたのち、マイクロプレートを洗浄した。そこに各々のエンテロトキシンの標準液およびインキュベート前後の上清を100μlマイクロプレートに入れた。室温で2時間おいたのち洗浄した。二次抗体ウサギ抗SEA（またはSEB、SEC）HRP（トキシンテクノロジー社製）を1%ウシ血清アルブミン溶液で希釈し100μlずつ分注した。室温で2時間おいたのち洗浄した。オルトフェニレンジアミン溶液を100μlずつ分注し室温で10分間おいた。4規定硫酸を100μlずつ分注し、492nmでの吸光度を測定した。標準液の吸光度と比較して各エンテロトキシンの濃度を求めた。

【0048】

（実施例2）

実施例1でえられたエポキシ化セルロファインGC200mを10mlとり、



n-オクチルアミン ( $\log P = 2.90$ ) 200 mg を加え、50 (v/v) %エタノール水溶液中、45℃で静置下、6日間反応させた。反応終了後、50 (v/v) %エタノール水溶液、エタノール、50 (v/v) %エタノール水溶液、水の順に十分に洗浄し、n-オクチルアミン固定化セルロファインGC200 m をえた。

## 【0049】

このn-オクチルアミン固定化セルロファインGC200 m を用いて、実施例1と同様に3種類のエンテロトキシンを含むFBSと振盪し、吸着材と上清を分離し、上清の各エンテロトキシン濃度をELISA法にて測定した。

## 【0050】

## (比較例1)

n-オクチルアミンをn-ヘキシルアミン ( $\log P = 2.06$ ) に変えたほかは、実施例2と同様にしてn-ヘキシルアミン固定化セルロファインGC200 m をえた。このn-ヘキシルアミン固定化セルロファインGC200 m を用いて、実施例1と同様に3種類のエンテロトキシンを含むFBSと振盪し、吸着材と上清を分離し、上清の各エンテロトキシン濃度をELISA法にて測定した。

## 【0051】

## (比較例2)

n-オクチルアミンをn-ブチルアミン ( $\log P = 0.97$ ) に変えたほかは、実施例2と同様にしてn-ブチルアミン固定化セルロファインGC200 m をえた。このn-ブチルアミン固定化セルロファインGC200 m を用いて、実施例1と同様に3種類のエンテロトキシンを含むFBSと振盪し、吸着材と上清を分離し、上清の各エンテロトキシン濃度をELISA法にて測定した。

## 【0052】

## (比較例3)

セルロファインGC-200 m を用いて、実施例1と同様に3種類のエンテロトキシンを含むFBSと振盪し、吸着材と上清を分離し、上清の各エンテロトキシン濃度をELISA法にて測定した。

## 【0053】

【表 1】

	エンテロトキシン濃度 (p g / m l)		
	SEA	SEB	SEC1
実施例 1	1 5 0	1 3 0	1 8 0
実施例 2	2 0 0	1 5 0	2 1 0
比較例 1	5 6 5	5 9 0	5 0 0
比較例 2	5 7 0	6 0 0	5 2 0
比較例 3	5 8 0	6 1 0	5 4 0

【 0 0 5 4 】

## 【発明の効果】

本発明の方法による水不溶性担体に  $\log P$  値 2.50 以上の化合物を固定化した吸着材を用いることで体液中のエンテロトキシンを効率よく吸着除去することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

本発明のエンテロトキシン吸着器の一実施例の概略断面図である。

## 【図 2】

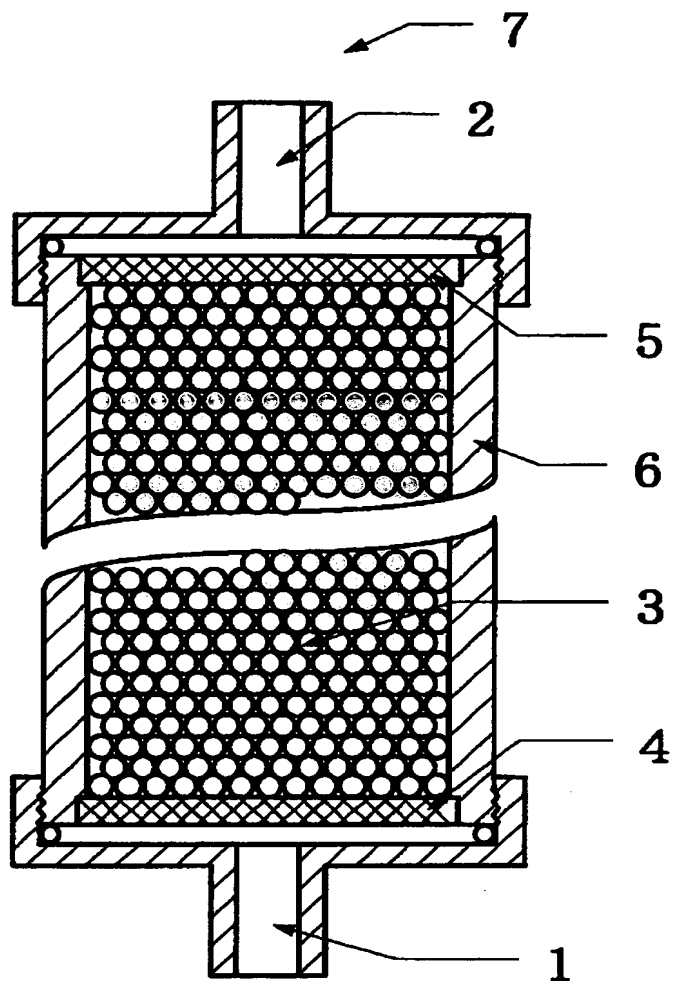
3 種類の材料を用いて流速と圧力損失との関係調べた結果を示すグラフである。

## 【符号の説明】

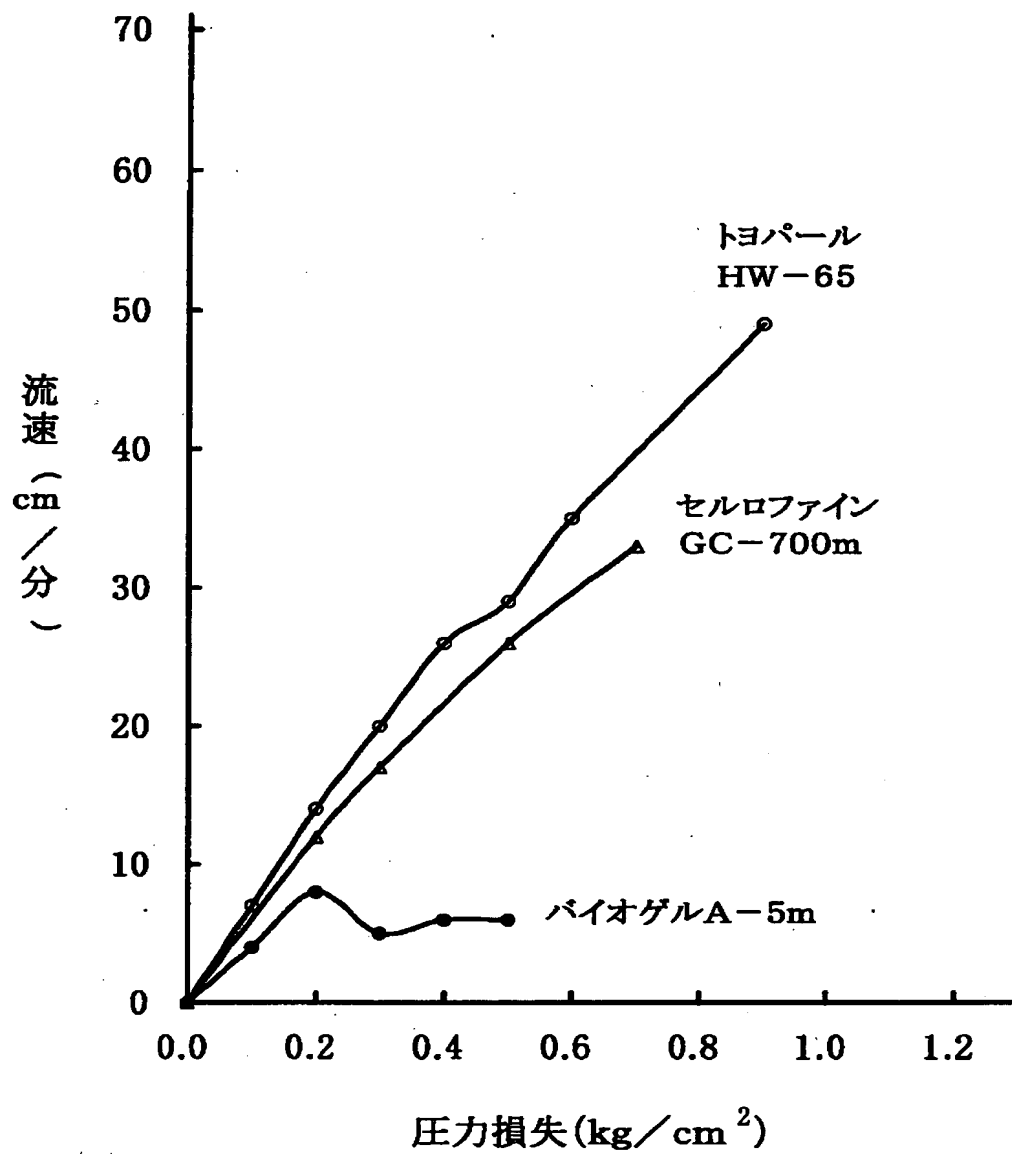
- 1    体液の流入口
- 2    体液の流出口
- 3    エンテロトキシン吸着材
- 4、5    体液および体液に含まれる成分は通過できるが前記エンテロトキシン吸着材は通過できないフィルター
- 6    カラム
- 7    エンテロトキシン吸着器

【書類名】 図面

【図 1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 体液中のエンテロトキシンを効率よく吸着除去することが可能な吸着材、ならびに吸着材により体液中のエンテロトキシンを除去する方法を提供すること。

【解決手段】 水不溶性担体に  $\log P$  ( $P$  はオクタノール-水系での分配係数) 値が 2.50 以上の化合物を固定してなるエンテロトキシンの吸着材をえる。このエンテロトキシン吸着材に体液を接触させることにより体液中のエンテロトキシンを効率よく吸着除去することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月27日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
氏 名 鐘淵化学工業株式会社